

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-310097
(P2003-310097A)

(43) 公開日 平成15年11月5日 (2003.11.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 0 1 K 67/027	Z N A	A 0 1 K 67/027	Z N A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2002-118714 (P2002-118714)

(22) 出願日 平成14年4月22日 (2002.4.22)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年11月26日
発行の「第24回日本分子生物学会年会 プログラム・講演
要旨集」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 岡野 栄之

東京都文京区本駒込6-13-15 メゾン・
ド・ジャルダン104号

(72) 発明者 榊原 伸一

栃木県下都賀郡壬生町落合2-12-2 小
貫マンション201

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムサシ蛋白質2遺伝子欠損動物

(57) 【要約】

【解決手段】 ムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損した
非ヒト動物又はその子孫。

【効果】 本発明のMsi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝
子欠損動物は、Msi1及びMsi2の内分泌系細胞における役
割を解明するために有用であり、高血糖症、低血糖症及
び糖尿病のモデル動物としても有用であり、これらの疾
患治療薬のスクリーニングに使用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫。

【請求項2】 さらにムサシ蛋白質1遺伝子の機能が欠損しているものである請求項1記載の動物。

【請求項3】 ムサシ蛋白質2遺伝子のいずれかの部位が欠失しているか、又はムサシ蛋白質2遺伝子のいずれかの部位に他の遺伝子が挿入されることによりムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損したものである請求項1記載の動物。

【請求項4】 ムサシ蛋白質1遺伝子のいずれかの部位が欠失しているか、又はムサシ蛋白質1遺伝子のいずれかの部位に他の遺伝子が挿入されることによりムサシ蛋白質1遺伝子の機能が欠損したものである請求項2記載の動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は高血糖症、低血糖症及び糖尿病の治療薬の評価、これらの疾患のメカニズム解明等に有用なトランスジェニック非ヒト動物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】神経前駆細胞の増殖または分化において機能する多くの転写因子が同定されている。しかしながら、近年の神経細胞特異的RNA結合蛋白質の発見は、転写後調節の段階においても、前駆細胞からの神経細胞の発生が制御されている可能性を高めている。これらにはmRNAの安定化または翻訳調節による制御が含まれる。非脊椎動物および脊椎動物の両方で神経細胞RNA結合蛋白質が発見されており、これらは2種の遺伝子ファミリーに相当する。(Okano, Dev. Growth Diff. 37:619-629(1995))。ひとつは、Elavファミリーであり、このファミリーのメンバーは分裂後神経細胞で発現されており、神経細胞の生存または分化において機能していると考えられている(Akamatsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9885-9890(1999))。もう一つのファミリーであるムサシ(Musashi; Msi)ファミリーは、Elavファミリーと対照的に主として神経前駆細胞で発現している(Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996); Pincus et al., Ann. Neurol. 43:576-585(1998); Kaneko et al., Dev. Neurosci. 22:139-153(2000))。

【0003】また、かなりのMsi1蛋白質が成体になってからも継続して発現している(Sakakibara and Okano, J. Neurosci. 17:8300-8312(1997))。このように神経細胞の発生と維持に重要な役割を果たしているMsiファミリーのうち、ムサシ蛋白質1(Musashi1; Msi1)についてはクローニングされている(Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996))。しかし、哺乳類におけるもう一つのタイプであるムサシ蛋白質2(Musashi2; Msi

2)については、我々がその存在を示唆していたにすぎず、その機能も明らかにはされておらず、クローニングもされていない。そこで本発明者は、Msi2遺伝子をクローニングすべく種々検討した結果、成体マウス小脳より得られたラムダgt11 cDNAライブラリーよりクローニングに成功し、先に特許出願した(特願2001-250186)。しかしながら、成体におけるMsi2の機能についてはほとんど知られておらず、解明がまたれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは成体マウスの脾臓においてMsi1、Msi2、Numbがどのような発現パターンを示すかを検討したところ、意外にもMsi1、Msi2及びNumbはともに内分泌細胞が存在するテングルハンス島全体に発現していることが判明した。そこで、Msi2ノックアウトマウス、Msi1及びMsi2ダブルノックアウトマウスを作製したところ、これらのノックアウトマウスは脾臓においてインスリンとともにグルカゴンを異常発現しており、高血糖症、低血糖症及び糖尿病のモデル動物として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明はMsi2遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫を提供するものである。また、本発明はMsi1遺伝子及びMsi2遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明におけるマウスMsi2は、本発明者らが初めてクローニングしたRNA結合性蛋白質であり、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列を有するものである。ここで、配列番号2は、配列番号1における18アミノ酸(264から281)が欠失したアミノ酸配列を有するものである。これらの2種はMsi2のアイソフォームである。配列番号1をMsi2L、配列番号2をMsi2Sという。Msi2は、2個のRNA結合モチーフ(RRMs)を有し、これらのRRMはRNA結合蛋白質間でよく保存された配列であるRNP-1とRNP-2を有する。

【0007】Msi2遺伝子は、(1)配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものである。その塩基配列としては、配列番号3、4又は5で示される塩基配列が挙げられる。なお、配列番号3はMsi2遺伝子の全配列であり、配列番号4はMsi2Lのコード領域であり、配列番号5はMsi2Sのコード領域である。

【0008】Msi2遺伝子は、脊椎動物、例えばマウスの小脳を用いてcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望のクローンを選択する方法により得ることができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613(1981); Science, 222, 778(1983)など〕。Msi2遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、

例えばcDNAによって産生される蛋白質(Msi2)に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、これらの組合せなどを例示できる。

【0009】Msi1遺伝子は前記のSakakibara et al., Dev. Biol., 176:230-242(1996)により得ることができる。Msi1のアミノ酸配列及びMsi1遺伝子の塩基配列を配列番号6に示す。

【0010】本発明において、「遺伝子の機能が欠損した」とは、該遺伝子の遺伝子産物であるMsi2又はMsi1が正常に産生されないことをいい、Msi2又はMsi1自体が産生されないこと及び一部を欠損するなどして機能を発現し得ないMsi2又はMsi1様タンパク質を産生することが含まれる。

【0011】本発明のMsi2遺伝子の機能欠損動物を得るためには、これらの遺伝子をクローニングし、インビトロで該遺伝子の機能を欠損させた後に、該欠損遺伝子を動物に戻して染色体上のMsi2遺伝子との間で相同組換えを起こさせ、染色体上のMsi2遺伝子を破壊し、その動物自体又はその子孫の該遺伝子の機能を欠損させるという方法が一般的に用いられる。またMsi2及びMsi1遺伝子の機能欠損動物を得るには、上記の方法で作成したMsi2機能欠損動物を既存のMsi1機能欠損動物（特開2001-17027）と交配させることによって得られる。

【0012】遺伝子の機能を欠損させる方法としては、遺伝子に人為的に変異を加えて該遺伝子を破壊する方法が挙げられ、例えばプロモーター領域及び／又はコード領域の少なくとも一部の欠失や、他の遺伝子を挿入又は置換することが挙げられる。

【0013】本発明でいう非ヒト動物は、Msi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子の機能が欠損したものであればよく、Msi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子がヘテロに欠損している動物及びホモに欠損している動物のいずれもが含まれる。また、使用される動物は特に限定されず、ヒトを除く全ての動物が挙げられ、好ましくはモルモット、ハムスター、マウス、ラット、ウサギ、ブタ等の哺乳動物であり、病態モデルとしての扱いが容易で且つ生物サイクルが比較的短い齧歯動物、特にマウスが好ましい。

【0014】動物に遺伝子を導入してその動物の個体又は子孫にその遺伝子を発現させる手法としては、従来からトランスジェニック動物の作成に常用されている公知の手法を挙げることができ、例えば遺伝子DNAを受精卵の前核期胚に注入する方法、組換えレトロウイルスを初期胚に感染させる方法、相同組換えを起こさせた胚性幹細胞（ES細胞）を胚盤胞又は8細胞期胚に注入する方法等によって得られた宿主胚を動物に移植して産仔を得、これを他の個体と交配し、F1ヘテロ変異動物、さ

らにはF2ホモ又はヘミ変異動物を作成する方法が挙げられる。このうち、ES細胞を用いる遺伝子導入の方法は、相同組換えにより遺伝子を破壊（ノックアウト）するのに適しており、ES細胞に遺伝子を導入する工程とキメラ動物を作出する工程とを分けて行えるという利点を有しているので好ましい。ES細胞を用いる遺伝子導入の方法は、公知の方法に準じて行えばよい。

【0015】以下、ES細胞を用いた遺伝子の導入の方法について、マウスを例にして具体的に説明する。マウスのMsi2遺伝子機能の欠損には、プロモーター領域及び／又はコード領域の少なくとも一部を欠失させるか、いずれかの部位に他の遺伝子を挿入すればよい。また、これらの遺伝子の機能を欠損させることができる限り、欠失又は他の遺伝子を挿入する部位は、イントロンであってもよい。そして、Msi2遺伝子との間で相同組換えを行うにあたり、このように遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA（ターゲティングベクター）を作製する。

【0016】挿入する遺伝子としては、Msi2遺伝子の欠損を検出するためのマーカー遺伝子として機能する遺伝子を用いることが好ましく、そのような遺伝子としては、ポジティブ選別に用いるマーカー遺伝子として、例えばネオマイシン（neo）耐性遺伝子が、ネガティブ選別に用いるマーカー遺伝子として、例えばチミジンキナーゼ（tk）遺伝子やジフテリアトキシンAフラグメント（DT-A）遺伝子等が用いられる。尚、ネオマイシン耐性遺伝子は、ネオマイシン類似体であるG418を用いることにより目的遺伝子の選別を可能にする。

【0017】好ましい遺伝子ターゲティングとしては、ターゲティングベクターとして、ポジティブ選別マーカーが標的遺伝子の上に置換されている置換型ベクターを用いる方法と、標的遺伝子の上流に選択マーカーを含むベクターのバックボーンにあたる非相同領域を挿入することによって、その遺伝子の発現を抑制する挿入型ベクターを用いる方法などが挙げられる。尚、これらの遺伝子の挿入は、インビトロで常用のDNA組換え技術により行うことができる。

【0018】次に、こうして得られたターゲティングベクターと、ES細胞中のMsi2遺伝子との間で相同組換えを行う。相同組換え用DNAのES細胞への導入は、例えば常用のエレクトロポレーションにより行うことができる。この相同組換えにおいては、ES細胞中のMsi2遺伝子のDNAと相同組換え用DNAの対応する領域との間で組換えが生じ、相同組換え用DNA中に挿入されていたマーカー遺伝子がES細胞のゲノムのMsi2遺伝子に挿入される。この結果、ES細胞は、Msi2遺伝子の機能を欠損し、同時にマーカー遺伝子を含むことになる。このマーカー遺伝子の選別機能に基づいて、Msi2遺伝子の機能を欠損したES細胞を選別することができる。

【0019】次に、このES細胞をマウスの胚盤胞等の

宿主胚に注入し、得られた胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植してキメラマウスを得る。このキメラマウスを適当な系統のマウスと交配することによりF1ヘテロ型の産仔を得る。キメラマウスの生殖細胞が相同組換え体、すなわちMsi2遺伝子が破壊されているES細胞に由来していれば、Msi2遺伝子の機能が欠損したマウスを得ることができる。また、得られたヘテロ欠損動物同士を交配させ、その産仔の中からホモ欠損動物を得ることができる。

【0020】Msi2遺伝子の欠損や、該遺伝子がヘテロ又はホモに欠損したものであるかは、離乳に至った後に尾からDNAを注出後、サザンブロット又はPCRを行って、確認することができる。

【0021】尚、本発明の動物の飼育方法は、特別な方法を用いる必要はなく、正常な動物と同様な方法により飼育することができる。

【0022】本発明により得られたMsi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子の機能が欠損した動物は、後記実施例で示すように、ヒトの高血糖症や糖尿病と同様の症状、例えば膵臓においてインスリンとともにグルカゴンの異常発現を呈する。従って、本発明の動物は高血糖症、低血糖症及び糖尿病のモデル動物、これらの疾患発生のメカニズム解明用動物となり得る。

【0023】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0024】A.材料と方法(1)マウスmsi2遺伝子cDNAのクローニング成体マウス小脳より得られたラムダgt11 cDNAライブラリー (Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996)) はマウスmsi1遺伝子コード領域 (Genbankアクセション番号#D4965, Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996)) の1.1キロ塩基対のEcoRI断片およびアフリカツメガエルxrp1 cDNA (Genbankアクセション番号#L02953, Good et al., Nucl. Acids. Res. 21:999-1006(1993)) コード領域カルボキシル末端を含む387塩基対のBamHI-NdeI断片を用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、 1×10^7 個のブラークに対して、msi1遺伝子プローブを用いて60°Cで、またxrp1遺伝子プローブを用いて55°Cで、18時間から24時間の間、 5×10^6 cpm/mlの 32 P標識されたランダムプライムドプローブを含む緩衝液 (1M塩化ナトリウム、1%SDS、10%硫酸デキストラン、0.1mg/ml鮭精子DNA) 中で行った。ハイブリダイゼーションされたフィルターは、 $2 \times$ SSC、0.1%SDS (低ストリンジェンシー) 中で室温にて20分間2回洗浄した。msi1遺伝子およびxrp1遺伝子プローブ両方にハイブリダイズした32個の陽性クローンが得られた。その中でxrp1 cDNAに強くハイブリダイズした9個が選択され、pBluescriptII (Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア州) にサブクローニングされ、そし

てダイプライマーキット (Amersham Pharmacia Biotech、バッキンガムシャー、イギリス) を用いて定法のダイデオキシヌクレオチドシークエンス法により塩基配列が決定された。シークエンス解析では、マウスmusashi2 (msi2) と名づけた、0.5キロ塩基対の5' 非翻訳領域、0.8キロ塩基対の3' 非翻訳領域、および1.0キロ塩基対の推定オープンリーディングフレーム (ORF) にわたる複数の重複クローンが明らかになった。推定上の選択スプライシングされるエクソンが予測コード領域のカルボキシル末端に54塩基対の挿入として発見され、msi2 cDNAのショートフォームとロングフォームのORFを形成していた。ショートフォームとロングフォームのmsi2転写物のin vivoでの発現はE12胎生期と成体の脳から単離されたRNAの逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 解析により確認された。類似性検索とアライメントがBLASTとFASTAアルゴリズムを用いてNCBIサーバーで行われた。系統樹解析 (DDBJのWWWサーバー上のclustalWプログラム) に用いられた蛋白質のアクセション番号は以下のとおりである。Hu (ヒト) U1snRNP70K (A25707)、Mus (マウス) hnRNP A1 (NP034577)、Hu hnRNP A0 (Q13151)、Mus hnRNP A2/B1 (O88569)、Hu hnRNP A3 (P51991)、Hu hnRNP A/Bタイプ (AAA36575)、ラット AUF1 (BAB03468、BAB03466、BAB03467)、Mus hnRNP C1/C2 (A403717)、Hu hnRNP F (S43484)、Mus hnRNP G (O35479)、Hu hnRNP H (I39358)、Mus PTB (hnRNP1) (P17225)、Mus brPTB (NP062423)、Hu hnRNP L (P14866)、Hu hnRNP M (P52272)、Hu hnRNP R (T02673)、Mus hnRNP U (NP058085)、Mus TIA-1 (P52912)、Mus TIAR (S72436)、Mus HuR (NP034615)、Mus HuB (AAC52644)、Mus HuC (Q60900)、Mus HuD (JC2298)、Hu Bruno13 (AAB09040)、Mus Lark (NP033058) およびRat La/SS-B (JC1494)。

【0025】(2) 動物および組織調整組織蛋白質抽出液、RNA、または組織切片の調整に用いたICR (CD-1) マウスはCharles River Japan Inc. (日本) から購入した。妊娠日は膈栓の存在により決定され、胎生0日目 (E0) として記録され、出生日をP0とした。

【0026】(3) ノーザンブロット解析各マウス組織および胎児よりトータルRNA (20 μ g) をメーカーの指示書に従いTrizol (Gibco-BRL、Grand Island、ニューヨーク州) を用いて単離した。1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルの電気泳動で分離し、バイオダインBナイロン膜 (Pall、Portwasington、ニューヨーク州) 上にトランスファーした。マウスmsi2 cDNA 750塩基対の3' 非翻訳領域断片の 32 P標識プローブは、ランダムプライムドDNA標識キット (Roche Diagnostics、マンハイム、ドイツ) を用いて調整し、50%ホルムアルデヒド、 $6 \times$ SSPE、 $5 \times$ デンハート液、0.5%SDS、および200 μ g/mlの鮭精子DNA中にて42°Cで16時間ハイブリダイズした。インキュベーション後、 $0.1 \times$ SSC、0.1%SDS中にて50°Cで厳密に洗浄し、フィルターはKodak X-OMATフィルムに48時

間露光した。トランスファーしたRNA標本の完全性は、各プロットを放射標識ベータアクチンプローブ (Clontech、パロアルト、カリフォルニア州) を用いて再プローブして確認を行った。

【0027】(4) 抗Msi2抗体の作製と精製Msi2蛋白質の14アミノ酸の末端配列 (MEANGSPGTSGSAN) に相当する、システインアミド残基が続くペプチドを抗体作製のために合成した。このペプチド配列はRNA結合ドメインであるRRM1の配列とは重複せず、Msi1蛋白質の対応するN末端領域とはいかなる類似性も示さない。約15mgのペプチドをシステインアミド残基を介して、m-ブロモスクシンイミド処理されたキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合し、ニュージーランドシロウサギに免疫性を与えるために使用した。抗Msi2抗血清をアフィニティ精製するため、メーカーの指示書に従い、合成ペプチド (5mg) を活性化した2-フルオロ-1-メチルピリジニウム-トルエン-4-スルホン酸塩 (FMP) セルロファイン (Seikagaku Kogyo, 日本) に共有結合させた。フィルターろ過 (0.45 μ m) した全抗血清10mlを、TBS緩衝液 (0.15M塩化ナトリウム、20mMトリス塩酸塩、pH7.5) を用いて事前に平衡化したペプチド-FMPセルロファインアフィニティ樹脂3mlとともに4°Cでインキュベートした。その後1M塩化ナトリウム50ml、1%トライトンX-100、トリス塩酸塩20mM (pH 7.5)、続いて0.15M塩化ナトリウム20mlを用いて樹脂を洗浄し、100mMグリシン塩酸塩4ml (pH 2.0) を用いて4°Cで溶出し、直ちに1Mトリス0.2mlで中和した。

【0028】(5) 組み換えMsi1およびMsi2蛋白質Msi2蛋白質のショートフォームとロングフォームのORFに相当する983塩基対と1072塩基対のBamHI-EcoRI断片はE12胎生期および成体の脳のRNAからRT-PCRにより単離した。発現ベクターpRSET-A (Invitrogen, Carlsbad, カリフォルニア州) にインフレイムにサブクローニングし、pRSET-Msi2S (ショートフォーム) とpRSET-Msi2L (ロングフォーム) を構築し、6ヒスチジン残基をアミノ末端に有する融合蛋白質が生成した。発現ベクターpRSET-Msi1 (Sakakibara et al., 1996)、pRSET-Msi2S、およびpRSET-Msi2LはBL21 (DE3) pLysS大腸菌株に導入し、1mIPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) を用いて30°Cで6時間インキュベーションすることで融合蛋白質を誘導した。組み換え融合蛋白質 (His₆-Msi2S、His₆-Msi2L、およびHis₆-Msi1) は、供給メーカーの指示通りに、Probond樹脂 (Invitrogen) カラムを用いてアフィニティ精製した。融合蛋白質の純度と濃度は、溶出液のSDSポリアクリルアミド (PAGE) ゲルをクマシーブリリアントブルー (Sigma) 染色、およびブラッドフォード定量法 (Biorad, ヘラクレス、カリフォルニア州) で確認した。

【0029】(6) プロテインフォスファターゼ処理および免疫ブロッティング法組織抽出液は緩衝液A (50mMト

リス塩酸塩 pH7.6、1mM酢酸カリウム、1.5mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール (DTT)、100 μ g/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、5 μ g/ml アプロチニン、5 μ g/ml ロイペプチン) を用いてホモジナイズし、続いて10,000 \times gにて10分間遠心分離した。細菌で発現した精製組み換え蛋白質 (50ng/レーン) または組織抽出液 (蛋白質量30 μ g/レーン) は10%SDS-PAGEゲルで分離し、セミドライ転写装置を用いてImmobilon-P膜 (Millipore, ベッドフォード、マサチューセッツ州) にエレクトロブロットした。各組織から等量の総蛋白質がロードされたことは、標準ブラッドフォード定量法で確かめ、二重複製ゲルをクマシーブルー染色することで立証した。化学発光シグナルは、メーカーの指示に従い、ECL (Amersham Pharmacia Biotech) によりKodak X-OMATフィルムを用いて検出した。蛋白質脱リン酸化測定を行うため、内在性のMsi2蛋白質が胎生期脳抽出液 (E12.5) より部分精製した。E12.5の脳 (湿重量で1.0g) を緩衝液A5mlにホモジナイズし、遠心分離して核を沈殿させた (12,000 \times g、10分間、4°C)。上清を取り除き、ショ糖1.5ml (緩衝液A中にて30% w/v) のクッション上に静かに重層し、130,000 \times g、4°Cで2時間、BeckmanSW55Tiローターを用いて遠心分離した。S130上清とショ糖クッションを除いた後、沈殿したポリソーム画分をすすいで取り出し、緩衝液A 500 μ l中に再懸濁した。かなりの量のMsi2蛋白質をこのポリソーム画分から回収した。プロテインフォスファターゼ処理のために、精製ポリソーム画分由来の蛋白質10 μ gを、25 μ lの50mMトリス (pH7.5)、0.1mM EDTA、5mM DTT、0.01%ブリッジ35、2mM塩化マンガン、10 μ g/ml PMSF、5 μ g/ml アプロチニン、5 μ g/ml ロイペプチン中で800ユニットのラムダプロテインフォスファターゼ (λ PPase) (New England Bio Labs, Beverly, マサチューセッツ州) とともに30°Cで1時間インキュベートした。 λ PPaseはリン酸化されたセリン、スレオニン、チロシン残基を脱リン酸化する。 λ PPaseを含まない対照サンプルも上述のよにインキュベートした。反応はSDS-PAGEサンプル緩衝液を用いて停止し、免疫ブロッティング法に関して10%SDS-PAGEゲルにて分離した。

【0030】(7) in vitro転写/翻訳およびRNA結合アッセイMsi2ロングフォームのコード領域 (524-1564番の塩基) とMsi1のコード領域 (64-1152番の塩基、アクセシオン番号D49654) に相当するcDNA断片を、FLAGタグをアミノ末端にコードするプライマーを用いてPCRにより単離した。pCDNA3 (Invitrogen) にサブクローニングし、発現ベクターpCDNA-msi2およびpCDNA-msi1を構築した。これらのプラスミドはウサギ網状赤血球溶解液 (TNT T7 Quick coupled転写/翻訳系、Promega、マジソン、ウィスコンシン州) 中で、メーカーの推奨する条件に従い、0.4mCi/ml ³⁵Sメチオニン (Amersham Pharmacia Biotech) 存在下にて転写/翻訳させた。61キログルトン

のルシフェラーゼ蛋白質をコードするルシフェラーゼT7コントロールベクター (Promega) もまた上述のとおり invitro で翻訳させた。in vitro 翻訳された蛋白質のRNAホモポリマーへの結合については若干の変更を加えたが、基本的には以前に記載されたように行った (Swanson and Dreyfuss, 1988)。簡潔に述べると、結合緩衝液 (10mM トリス塩酸塩、pH 7.4、2.5mM 塩化マグネシウム、0.5% トライトン X-100、2mg/ml ペプスタチン、2mg/ml ロイペプチン、0.5% アプロチニン、1mg/ml ヘパリン) により平衡化した各20 μ l のリボホモポリマー-アガロースビーズを³⁵S 標識された蛋白質 (1 \times 10⁵ cpm) とともに、100mM または250mM の塩化ナトリウムを含む500 μ l の結合緩衝液中にて、15分間振動台上で4 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。ビーズは短時間の回転で沈殿し、50 μ l SDS-PAGE ローディング緩衝液に再懸濁する前に結合緩衝液500 μ l で5回洗浄した。結合した蛋白質は煮沸により溶出させ、10% SDS-PAGEにて分離して、フルオログラフィーにより可視化させた。

【0031】(8) ターゲティングベクターの構築ネオマイシン耐性遺伝子上流に、Msi1の開始コドンを含む第一エキソンの上流に存在する4.4kbのXbaIの断片、下流にRRM-A領域をコードする領域を含む第二エキソンの下流に存在する3.9kbのEcoRV-Ecl136I断片をつなげ、2度の相同性組換えによってMsi2遺伝子の102アミノ酸をDNAがネオマイシン耐性遺伝子に置換されるようにデザインされたターゲティングベクターを用いた (図1及び2)。

【0032】(9) キメラマウスの作製ターゲティングベクターをトランスフェクションすることによって、片方のMsi2遺伝子座をネオマイシン耐性遺伝子に置換したES細胞 (129SvJ/RW-4株) を、C57BL/6マウスを (C57BL/6 \times D \times BA) F1マウスと交配させて得られた胚細胞に注入し、キメラ動物を誕生させた。各ES細胞株に由来する雄キメラをC57BL/6雌と交配させ、ヘテロ接合体F1子孫を出生させた。F1ヘテロ接合体同士を交配し、Msi2 $^{-/-}$ マウスを取得した。

【0033】B. 結果(1) Msi2の同定とその一次構造の特性Msi2のcDNAの単離を目的に、マウスmsi1およびXenopus xrp1 cDNAプローブを用いて、低減したストリンジェンシーにて、マウス神経系cDNAライブラリーをスクリーニングした。Xenopus xrp1遺伝子 (Good et al., Nucl. Acids Res. 21:999-1006(1993)) はMsi1 (Skakiba et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996)) のアフリカツメガエル相同体であるNRP1蛋白質に配列上関連付けられる蛋白質をコードしている。全長cDNAを得るため、獲得された最長のDNAを、厳しいストリンジェンシーにてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。予測分子量37キロダルトンの346アミノ酸の蛋白質をコードする最長かつ唯一のオープンリーディングフレームが、9個の重複したcDNAより同定された。配列解析により、cDNAにコードされる遺伝子産物が新規

のRNA結合蛋白質であることが明らかとなった。我々はこのMsi1関連遺伝子をmusashi2 (msi2) と名づけた。ライブラリースクリーニングから得た複数のcDNAクローン、およびE12と成体のマウス脳から単離したRNA由来のmsi2転写物について、RT-PCR解析することで2種の選択スプライスされた転写産物が存在することが示された。この2種はMsi2のカルボキシ末端半分内の短いセグメント (18アミノ酸) の存在、非存在により分けられる。この選択スプライスは、予測分子量36.9および35.7キロダルトン (Msi2LおよびMsi2Sと各々名づけた) の2種のMsi2蛋白質のアイソフォームが生成することを示している。Msi2Lのアミノ酸配列を配列番号1に、Msi2のアミノ酸配列を配列番号2に示した。またmsi2Lの塩基配列を配列番号4に、msi2Sの塩基配列を配列番号5に示した。

【0034】(2) Msi2遺伝子欠損マウスの性質Msi2 $^{-/-}$ マウスは肉眼的には正常であったが、膵臓のランゲルハンス島において、アルファ細胞とベータ細胞の局在に異常があった。(図3: 緑が抗インスリン抗体を用いて染色したベータ細胞を示し、赤がグルカゴン抗体を用いて染色したアルファ細胞を示す。) 図に示したように、野生型のランゲルハンス島ではベータ細胞塊の外側をアルファ細胞が覆うような構造を示すが、Msi2 $^{-/-}$ マウスにおいてはベータ細胞がインスリンと共にグルカゴンを発現している。

【0035】(3) Msi2及びMsi1遺伝子欠損マウスの性質Msi1 $^{+/-}$ (特開2001-17027) \cdot Msi2 $^{+/-}$ (Msi1, 2ダブルヘテロ) のマウス同士を交配させる (図4) と、メンデルの法則に従うとMsi1 $^{-/-}$ \cdot Msi2 $^{-/-}$ (Msi1, 2ダブルホモ) マウスは1/16の確立で産まれるが、実際には産まれた全個体数164匹に対してMsi1 $^{-/-}$ \cdot Msi2 $^{-/-}$ マウスは7匹しか産まれなかった。これは、約1/23であり、Msi1 $^{-/-}$ \cdot Msi2 $^{-/-}$ (Msi1, 2ダブルホモ) マウスが産まれる確立はメンデルの法則と比較して若干少なく、胎生期において死亡が推測された。出生した個体も、チアノーゼの様相を呈し、母乳を飲んでおらず、出生後数時間で死亡した (図5)。またMsi1 $^{-/-}$ \cdot Msi2 $^{-/-}$ (Msi1, 2ダブルホモ) マウスは、Msi2 $^{-/-}$ マウス同様、ランゲルハンス島において、アルファ細胞とベータ細胞の局在に異常があった (図3)。Msi1 $^{-/-}$ \cdot Msi2 $^{-/-}$ (Msi1, 2ダブルホモ) マウスはMsi2 $^{-/-}$ マウスに比べ、アルファ細胞がベータ細胞塊に入り込むなどの症状も見られ、より重度の異常が見られた。

【0036】

【発明の効果】本発明のMsi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子欠損動物は、Msi1及びMsi2の内分泌系細胞における役割を解明するために有用であり、高血糖症、低血糖症、糖尿病等のモデル動物としても有用であり、これらの疾患治療薬のスクリーニングに使用することもできる。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Animal deficient in Musashi2 gene

<130> P01951404

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

```

Met Glu Ala Asn Gly Ser Pro Gly Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asp Ser
  1              5              10              15
Gln His Asp Pro Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr
              20              25              30
Ser Pro Asp Ser Leu Arg Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Ile Arg
              35              40              45
Glu Cys Met Val Met Arg Asp Pro Thr Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe
              50              55              60
Gly Phe Val Thr Phe Ala Asp Pro Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Gly
  65              70              75              80

```

```

Gln Pro His His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala
              85              90              95
Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
              100             105             110
Phe Val Gly Gly Leu Ser Ala Asn Thr Val Val Glu Asp Val Lys Gln
              115             120             125
Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Glu Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
              130             135             140
Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Asn
              145             150             155             160
Glu Asp Val Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
              165             170             175
Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Arg Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Phe
              180             185             190
Pro Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala Arg Gly Leu Pro Tyr Thr Met Asp
              195             200             205
Ala Phe Met Leu Gly Met Gly Met Leu Gly Tyr Pro Asn Phe Val Ala
              210             215             220
Thr Tyr Gly Arg Gly Tyr Pro Gly Phe Ala Pro Ser Tyr Gly Tyr Gln
              225             230             235             240

Phe Pro Gly Phe Pro Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Val Ala Ala Ala Ala
              245             250             255

```

Val Ala Ala Ala Arg Gly Ser Val Leu Asn Ser Tyr Ser Ala Gln Pro
260 265 270
Asn Phe Gly Ala Pro Ala Ser Pro Ala Gly Ser Asn Pro Ala Arg Pro
275 280 285
Gly Gly Phe Pro Gly Ala Asn Ser Pro Gly Pro Val Ala Asp Leu Tyr
290 295 300
Gly Pro Ala Ser Gln Asp Ser Gly Val Gly Asn Tyr Ile Ser Ala Ala
305 310 315 320
Ser Pro Gln Pro Gly Ser Gly Phe Gly His Gly Ile Ala Gly Pro Leu
325 330 335
Ile Ala Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His
340 345
<210> 2
<211> 328
<212> PRT
<213> Mouse
<400> 2
Met Glu Ala Asn Gly Ser Pro Gly Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asp Ser
1 5 10 15
Gln His Asp Pro Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr
20 25 30
Ser Pro Asp Ser Leu Arg Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Ile Arg
35 40 45
Glu Cys Met Val Met Arg Asp Pro Thr Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe
50 55 60
Gly Phe Val Thr Phe Ala Asp Pro Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Gly
65 70 75 80
Gln Pro His His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala
85 90 95
Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
100 105 110
Phe Val Gly Gly Leu Ser Ala Asn Thr Val Val Glu Asp Val Lys Gln
115 120 125
Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Glu Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
130 135 140
Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Asn
145 150 155 160
Glu Asp Val Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
165 170 175
Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Arg Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Phe
180 185 190
Pro Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala Arg Gly Leu Pro Tyr Thr Met Asp
195 200 205
Ala Phe Met Leu Gly Met Gly Met Leu Gly Tyr Pro Asn Phe Val Ala
210 215 220
Thr Tyr Gly Arg Gly Tyr Pro Gly Phe Ala Pro Ser Tyr Gly Tyr Gln
225 230 235 240
Phe Pro Gly Phe Pro Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Val Ala Ala Ala Ala
245 250 255

Val Ala Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Asn Pro Ala Arg Pro Gly Gly
 260 265 270
 Phe Pro Gly Ala Asn Ser Pro Gly Pro Val Ala Asp Leu Tyr Gly Pro
 275 280 285
 Ala Ser Gln Asp Ser Gly Val Gly Asn Tyr Ile Ser Ala Ala Ser Pro
 290 295 300
 Gln Pro Gly Ser Gly Phe Gly His Gly Ile Ala Gly Pro Leu Ile Ala
 305 310 315 320
 Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His
 325

<210> 3

<211> 2370

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

cgccaactgc ccttccaagt kgcacactgt acatctgtga gtgggtgtta gtgtctgggt 60
 gtgaacctca aagagagaga acatctactt cctagggctc acactgaagg gacctggggc 120
 agtcatttaa aaagaactct gaagcttcaa atggtgatcc tagtcagagc acatagattt 180
 cctaccctg acataaaaat attcttagct aaagctgcca gaattaatgt aatgattaaa 240
 ttctctcaca gggatattta aacattgttt acatatgaaa tgtgcactctg ctgccaaaatg 300
 ctactgtcca atatgcggtg catatacact ggacctgcag tgatggaatc atcccagatg 360
 ggtcttctca acactggccc catcccaatg caaaacggct ccacgcgtgt ggtgtggcac 420
 cctccttttg gccctagagt tcttgaagc tcttggtggg atgaagctg tagatgatga 480
 tgtcatgcac cctgggtact cctttccaaa ttggggctcc gctatggagg caaatgggag 540
 cccaggcacc tcgggcagcg ccaacgactc ccagcagcac cccggtaaaa tgtttatcgg 600
 tggactgagc tggcagacct caccagatag ccttagagac tatttttagca aatttgaga 660
 aattagagaa tgtatggtca tgagagatcc cacaacgaaa cgctccagag gcttcgggtt 720
 cgtcaccctc gcagaccag caagtgtaga taaagtatta ggtcagcccc accatgagtt 780
 agattccaag acgattgacc caaaagttgc atttcctcgt cgagcgcaac ctaagatggt 840
 cacaagaaca aagaaaatct tcgtaggagg attgtctgcg aacacagtag tggaagatgt 900
 aaagcagtat ttcgagcagt ttggcaaggt agaggatgag atgctgatgt tcgacaaaac 960
 caccaacagg cacagagggt ttgctttgt cacccttgag aatgaagacg ttgtggagaa 1020
 agtctgtgag attcatttcc atgaaatcaa taataaaatg gtagaatgta agaaagctca 1080
 gccgaaagaa gtcattgtcc cactgggac aagaggccgg gcccgggggc tgccatacac 1140
 catggatgag ttcattgttg gcatgggat gctgggctac ccaactttg tggcaacctc 1200
 tggcagaggc tacccggat ttgtcctag ctatggctac cagttcccag gcttcccggc 1260
 agcagcttat ggaccagtgg cagcggcagc tgtggcagcg gctcaggat cagtcctgaa 1320
 tagctacagt gctcaaccga attttggcgc gcccgcttcc ccggcaggct ccaacccggc 1380
 gcggcccgga ggttcccg ggccaacag cccaggacct gtcgccgac tctacggccc 1440
 tgccagccag gactccggag tgggaatta cataagcgc gccagccac agccgggctc 1500
 cggttcggc cagggcatag ctggacctt gattgcaacg gcctttacaa atggatacca 1560
 ctgagcagcg gcttccattg ccgtctcact atgagagcat acctggatgt ccaggcaaga 1620
 ctgggcgaag ttctgagtg gccctttgt taggtgacgt cctcagacct ggaccccccac 1680
 cagctcact cctcatccca accagagtg gcacacttg attgagggtt gacacatctc 1740
 atctcaccca tcgctacct gctgtaatat aagacaacag cttttaaacg tgtatataat 1800
 ccatgatttt ggtttggtc tgtttgttt ccttggttgt cccctctcc cctcctctct 1860
 tctcctttta aatctccctc aatcacattt ggtagtgatt ttgacttag tctgtagtc 1920
 acccagctta atatctagtt aaagctaacc atagtatact tgttatatat taaggagttt 1980
 tttttttct ttcttttgtt ttctttttc ctttaaagag aatttttgtt ttgttttgat 2040
 tctgttctcg cttttaaagg atgctgagat ggtgatgta ctctccattt ttgtaccag 2100

```

ttctgagact gtaagacttt tcctctggga ctttagcaca cactgaatcg aagtgtgat 2160
acgcggagcg ggaggtgggc atagactcta ttttgtgttg tagaagtac atacagttgg 2220
ctgcttaaca gactctctag ccgttcattt ttgtgacgtc tctttgttaa cctaagtata 2280
tctattttgc gcaataaggt aaggacggcc gtgttttgag ggtcttcctt tcctatgagt 2340
gctttttctt ttcttctgtt caaagaggtc
2370

```

<210> 4

<211> 1038

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

```

atggaggcaa atgggagccc aggcacctcg ggcagcgcca acgactccca gcacgacccc 60
ggtaaaatgt ttatcggtgg actgagctgg cagacctcac cagatagcct tagagactat 120
tttagcaaat ttggagaaat tagagaatgt atggtcata gaagatccac aacgaaacgc 180
tccagagget tcggtttcgt caccttcgca gaccacgcaa gtgtagataa agtattaggt 240
cagccccacc atgagttaga ttccaagacg attgacccaa aagttgcatt tcctcgtcga 300
gcgcaacctc agatggtcac aagaacaaa aaaatcttcg taggaggatt gtctgcgaac 360
acagtagtgg aagatgtaaa gcagtatttc gagcagtttg gcaaggtaga ggatgcgatg 420
ctgatgttcg aaaaaccac caacaggcac agagggtttg gctttgtcac ctttgagaat 480
gaagacgttg tggagaaagt ctgtgagatt catttccatg aaatcaataa taaaatggta 540
gaatgtaaga aagctcagcc gaaagaagtc atgttccac ctgggacaag aggcggggcc 600
cgggggctgc catacaccat ggatgcgttc atgettggca tggggatget gggtacccc 660
aactttgttg caacctatgg cagaggtac cccggatttg ctctagcta tggtaccag 720
ttcccagget tcccgcagc agcttatgga ccagtggcag cggcagctgt ggcagcggt 780
cgaggatcag tctgaatag ctacagtgtt caaccgaatt ttggcgcgcc cgttccccc 840
gcaggetcca acccgcgcg gcccggaggg ttcccggggg ccaacagccc aggacctgtc 900
gccgatctct acggccctgc cagccaggac tccggagtgg ggaattacat aagcgcggcc 960
agcccacagc cgggtcccg cttcggccac ggcatacttg gacctttgat tgcaacggcc 1020
tttacaatg gataccac
1038

```

<210> 5

<211> 984

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 5

```

atggaggcaa atgggagccc aggcacctcg ggcagcgcca acgactccca gcacgacccc 60
ggtaaaatgt ttatcggtgg actgagctgg cagacctcac cagatagcct tagagactat 120
tttagcaaat ttggagaaat tagagaatgt atggtcata gaagatccac aacgaaacgc 180
tccagagget tcggtttcgt caccttcgca gaccacgcaa gtgtagataa agtattaggt 240
cagccccacc atgagttaga ttccaagacg attgacccaa aagttgcatt tcctcgtcga 300
gcgcaacctc agatggtcac aagaacaaa aaaatcttcg taggaggatt gtctgcgaac 360
acagtagtgg aagatgtaaa gcagtatttc gagcagtttg gcaaggtaga ggatgcgatg 420
ctgatgttcg aaaaaccac caacaggcac agagggtttg gctttgtcac ctttgagaat 480
gaagacgttg tggagaaagt ctgtgagatt catttccatg aaatcaataa taaaatggta 540
gaatgtaaga aagctcagcc gaaagaagtc atgttccac ctgggacaag aggcggggcc 600
cgggggctgc catacaccat ggatgcgttc atgettggca tggggatget gggtacccc 660
aactttgttg caacctatgg cagaggtac cccggatttg ctctagcta tggtaccag 720
ttcccagget tcccgcagc agcttatgga ccagtggcag cggcagctgt ggcagcggt 780
cgaggatcag gctccaaccc ggcgcgccc ggaggtcttc cgggggcca cagcccagga 840
cctgtcgccg atctctacgg cctgccagc caggactccg gagtggggaa ttacataagc 900
ggggccagcc cacagccggg ctccggttc ggccacggca tagctggacc tttgattgca 960

```

```

acggccttta caaatggata ccac                                     984
<210> 6
<211> 1551
<212> DNA
<213> mouse
<220>
<221> CDS
<222> (64)..(1152)
<400> 7
cgccgagcgc cgccgcccgc gccgccgcgc ccgctccgct gcccgcgccg cccgcggctc 60

ccg atg gag act gac gcg ccc cag ccc ggc ctc gcc tcc ccg gac tcg   108
    Met Glu Thr Asp Ala Pro Gln Pro Gly Leu Ala Ser Pro Asp Ser
        1             5             10             15
ccg cac gac ccc tgc aag atg ttc atc gga gga ctc agt tgg cag acc   156
Pro His Asp Pro Cys Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr
        20             25             30
acg cag gaa ggg ctg cgc gaa tac ttc ggc cag ttc ggg gag gtg aaa   204
Thr Gln Glu Gly Leu Arg Glu Tyr Phe Gly Gln Phe Gly Glu Val Lys
        35             40             45
gag tgt ctg gtg atg cgg gac ccc ctg acc aaa aga tcc agg ggt ttc   252
Glu Cys Leu Val Met Arg Asp Pro Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe
        50             55             60
ggc ttc gtc act ttc atg gac cag gcg ggg gtg gat aaa gtg ctg gcg   300
Gly Phe Val Thr Phe Met Asp Gln Ala Gly Val Asp Lys Val Leu Ala
        65             70             75
caa tcg cgg cac gag ctc gac tcc aaa aca att gac ccc aag gtg gcc   348
Gln Ser Arg His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala
        80             85             90             95
ttt cct cga aga gca cag cct aag atg gtc act cgg acg aag aag atc   396
Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
        100            105            110
ttc gtg ggg ggg ctg tct gtg aac acc acg gtg gaa gat gtg aaa cac   444
Phe Val Gly Gly Leu Ser Val Asn Thr Thr Val Glu Asp Val Lys His
        115            120            125
tat ttc gag cag ttc gga aag gtg gat gat gcc atg ctg atg ttc gac   492
Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Asp Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
        130            135            140
aaa acc acc aac agg cac aga ggg ttt gga ttt gtc acg ttt gag agc   540
Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Ser
        145            150            155
gag gac atc gta gag aaa gtt tgt gag atc cac ttc cat gaa atc aac   588
Glu Asp Ile Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
        160            165            170            175
aac aaa atg gtg gaa tgc aag aaa gcc cag cca aag gag gtg atg tcc   636
Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Lys Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Ser
        180            185            190
ccg aca ggc tca gcc cgg ggc agg tct cgg gtc atg ccc tac gga atg   684
Pro Thr Gly Ser Ala Arg Gly Arg Ser Arg Val Met Pro Tyr Gly Met
        195            200            205

```

```

gat gcc ttc atg ctg ggt att ggg atg ctg ggt tac cca ggg ttc caa 732
Asp Ala Phe Met Leu Gly Ile Gly Met Leu Gly Tyr Pro Gly Phe Gln
      210                215                220
gcc acg acc tac gcc agc cgg agt tac aca ggc ctt gcc cct ggt tac 780
Ala Thr Thr Tyr Ala Ser Arg Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Pro Gly Tyr
      225                230                235
acc tac cag ttc ccc gaa ttc cgt gta gag cgg agc cct ctc ccg agc 828
Thr Tyr Gln Phe Pro Glu Phe Arg Val Glu Arg Ser Pro Leu Pro Ser
240                245                250                255
gcc cca gtc ctc ccc gag ctc aca gct atc cct ctc acg gct tat ggg 876
Ala Pro Val Leu Pro Glu Leu Thr Ala Ile Pro Leu Thr Ala Tyr Gly
      260                265                270
ccc atg gcg gcg gca gcg gcg gcg gca gct gta gtt cga ggg aca ggc 924
Pro Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Gly Thr Gly
      275                280                285
tct cac ccc tgg acg atg gct ccc cct cca ggt tcc act ccc agc cgc 972
Ser His Pro Trp Thr Met Ala Pro Pro Pro Gly Ser Thr Pro Ser Arg
      290                295                300
aca ggg ggc ttc cta ggg acc aca agc ccc ggc ccc atg gct gag ctc 1020
Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Thr Ser Pro Gly Pro Met Ala Glu Leu
      305                310                315
tac ggg gca gcc aac cag gac tcc ggg gtc agc agt tac atc agc gcc 1068
Tyr Gly Ala Ala Asn Gln Asp Ser Gly Val Ser Ser Tyr Ile Ser Ala
320                325                330                335
gcc agc ccc gcc ccc agc act ggt ttc ggc cac agt ctt ggg ggt ccc 1116
Ala Ser Pro Ala Pro Ser Thr Gly Phe Gly His Ser Leu Gly Gly Pro
      340                345                350

ttg att gcc aca gcc ttc acc aat ggg tac cac tga aacagggagg 1162
Leu Ile Ala Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His
      355                360
aggtacgagg agcgcgccag cctgcagctg actgaggacc agactgagcc agcaagggga 1222
ttgggacacc tccgccgcag cagccagacc ccttggtctg cacttgacc gctactgect 1282
gtccctcaac ccctggcccc agccccctca tgtctgctgc ccctaactaac ctctgttca 1342
gacctgtct ctctctctgc tcccactgc ctctctccct ggctgctttt atttattttt 1402
ggattagcca gttgccctac cccacacca gatctgacct ctctccggt ctgccccatc 1462
ctctcctgct gcccccttta gggcaccccc ccccagaaa ggcatactg gagggcgggc 1522
agagggggcc tgctgcagac tgaggcccc 1551

```

【図面の簡単な説明】

【図1】ターゲティングベクター構築のストラテジー（前半）を示す図である。

【図2】ターゲティングベクター構築のストラテジー（後半、図1のつづき）を示す図である。

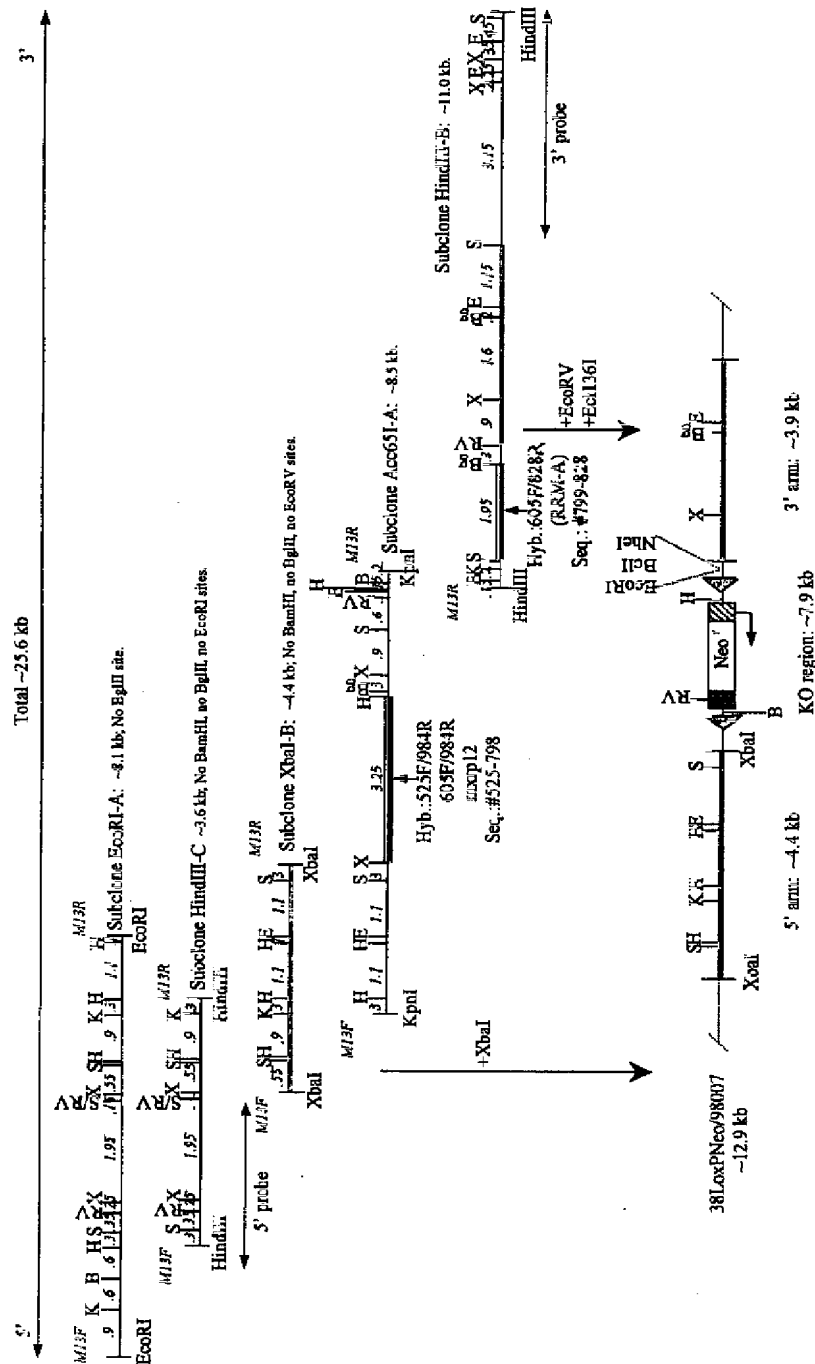
【図3】Msi2-/-マウスの脾臓ランゲルハンス島におけるインスリンとグルカゴンの発現を示す図である。wil

d:野生型、msi 1 ko:Msi1-/-、msi 2 ko:Msi2-/-、msi 1,2 ko:Msi1-/-・Msi2-/-（ダブルホモ）。

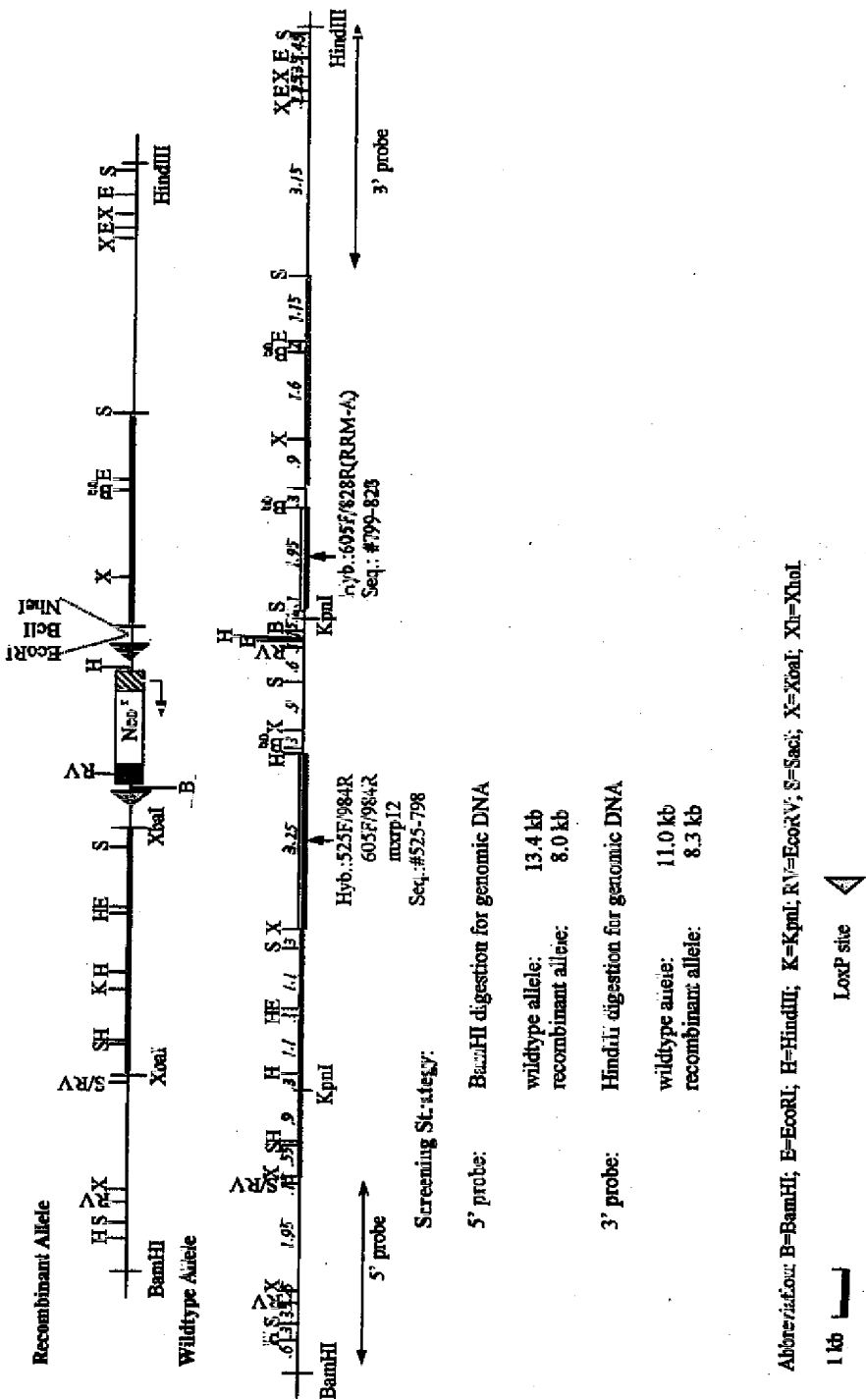
【図4】Msi1及びMsi2遺伝子欠損マウス作成のストラテジーを示す図である。

【図5】Msi1及びMsi2遺伝子欠損マウスの形態を示す図である。

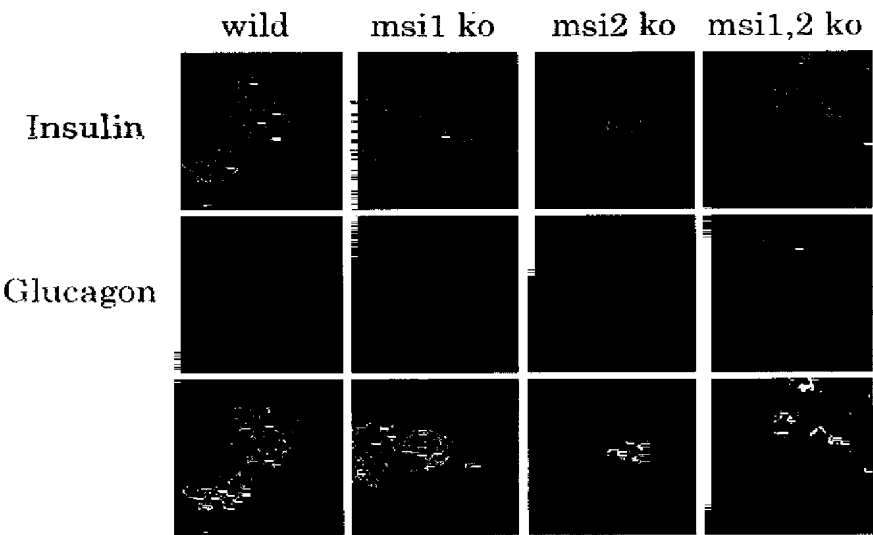
【 1】



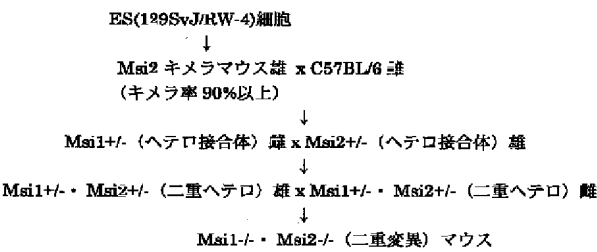
【图2】



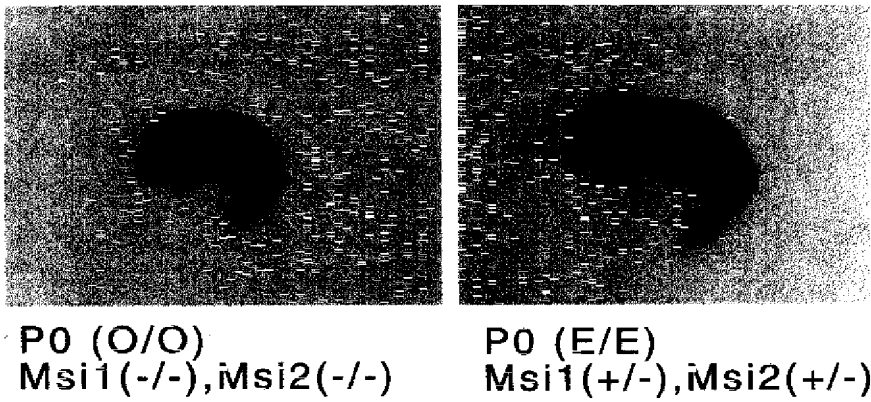
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 吉田 哲
東京都新宿区富久町2-4 ウエストヒル
ズ101

(72)発明者 徳永 暁憲
東京都渋谷区西原2-28-2 ガラーステ
ージ渋谷西原604号

(72)発明者 澤井 啓子
東京都港区六本木1-9-35 六本木ビュ
ータワー1206号

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA02 DA02 GA11
HA11